



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

FRANCIELLE PALMEIRA TELES DE MENDONÇA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CONTRA BACTÉRIAS
PATOGENICAS E DETERIORADORAS RELACIONADAS A
ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso

São Cristóvão - SE

Janeiro de 2018

Francielle Palmeira Teles de Mendonça

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CONTRA BACTÉRIAS
PATOGENICAS E DETERIORADORAS RELACIONADAS A
ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Ciências Biológicas entregue como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel
em Biologia.

Orientadora: Profª Drª Ana Andréa Teixeira Barbosa

São Cristóvão - SE

Janeiro de 2018

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CONTRA BACTÉRIAS
PATOGENICAS E DETERIORADORAS RELACIONADAS A
ALIMENTOS**

FRANCIELLE PALMEIRA TELES DE MENDONÇA

‘Esse documento foi julgado adequado para a obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo colegiado do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe. ‘

Ana Andréa Teixeira Barbosa, Dr^a.

Orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso

Banca Examinadora:

Nota: _____

Ana Andréa Teixeira Barbosa, Dr^a.

Orientadora

Hyrila Grazielle Silva de Araújo Couto, Doutoranda.

Flávio Henrique Ferreira Barbosa, Dr.

Média final: _____

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer imensamente a Deus por ter me ajudado e guiado nessa árdua caminhada da graduação.

Em segundo lugar, agradeço aos meus pais que, mesmo com toda a dificuldade, nunca mediram esforços para me darem a melhor educação possível, bem como todo o amor e carinho que um filho pode receber, agradeço imensamente. Minha mãe, Acácia, pelo exemplo ímpar de mulher, e a meu pai, João, por toda a sua garra.

A todos os meus familiares, que de alguma forma sempre me apoiaram, em especial ao meu irmão Humberto Matheus por ficar muitas vezes acordado de madrugada me apoiando nos estudos, a minha irmã Aislless Suellen por me ouvir apresentando vários trabalhos, e as minhas avós Cenila e Carmelita por serem exemplos de mulheres guerreiras.

Agradeço ao meu namorado, Matheus Vinícius, por sempre estar ao meu lado em todas as situações e decisões, sendo paciente mesmo quando estava estressada, me apoiando e incentivando na caminhada acadêmica, fico muito feliz em te ter ao meu lado, bem como a sua família, por sempre ser acolhedora, em especial a minha sogra Marília, que é uma segunda mãe pra mim, e a meu cunhado, Mário, que sempre se faz presente.

Agradeço aos meus colegas de curso, por passarmos por momentos difíceis juntos durante essa caminhada, em especial a Márcio, minha dupla fiel durante toda a graduação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia e Ecologia da Universidade Federal de Sergipe, em especial ao professor Alexandre, Sinara, Marcus Vinícius e Ana Paula, por todo o conhecimento compartilhado e dicas, sempre me lembrarei de vocês.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, por me permitir fazer os experimentos desse trabalho no Laboratório de Microbiologia geral, ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Fisiologia e ao Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Agronomia, bem como a todos os funcionários que direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho, muito obrigada.

À Hyrla, doutoranda do Departamento de Ciências Agrárias por toda a parceria no seu projeto de Doutorado, todos os ensinamentos e conselhos, aprendi muito na prática.

Por fim, agradeço muito à minha orientadora, professora Ana Andréa, por sempre estar comigo desde a matéria de Microbiologia geral, passando pela monitoria, estágio e agora o trabalho de conclusão de curso, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência, a senhora foi a segunda mãe na graduação para mim.

RESUMO

A busca por antimicrobianos naturais tem aumentado nos últimos anos e estimulado vários estudos com óleos essenciais (OE's) de plantas aromáticas, que têm sido apontados como alternativa na conservação de alimentos. Somando-se a essa informação, doenças de origem alimentar causadas por bactérias ainda são comuns no mundo inteiro, em que os sintomas variam de diarreia, nos casos mais simples, a óbito, nos casos mais graves. Diante de todo este cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de sete cultivares de *Ocimum basilicum* L. frente à seis estirpes de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 23226, *Bacillus cereus* ATCC 4504, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004, *Staphylococcus aureus* ATCC 8095 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. O espectro de atividade dos óleos contra os microrganismos foi avaliado pelo método de difusão em ágar. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM), dose bactericida mínima (DBM) seguindo metodologia do CLSI (2017) e o efeito do óleo no crescimento de *S. aureus* foi verificado pelo monitoramento do crescimento da cultura pela leitura da densidade óptica a 600 nm na presença de concentrações crescente dos óleos. O óleos em análise inibiram todas as bactérias testadas, demonstrando amplo espectro de atividade. A determinação da CIM e da DBM demonstraram heterogeneidade na sensibilidade dos microrganismos frente aos óleos essenciais dos diferentes cultivares. Considerando os menores valores de CIM e DBM, os óleos essenciais foram mais efetivos em inibir as bactérias Gram-negativo. Na maioria dos casos, a DBM foi maior que a CIM, demonstrando que em baixas concentrações os óleos exercem efeito bacteriostático e em altas concentrações, bactericida. A adição de concentrações crescentes dos óleos Mrs. Burns e Maria Bonita ao meio BHI resultaram no aumento da fase lag, diminuição da DO máxima e da taxa de crescimento de *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstram que os óleos testados apresentam potencial para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores relacionados a alimentos. Talvez a forma mais efetiva para esse uso seja pela incorporação dos óleos a revestimentos comestíveis. O melhor tipo de revestimento e o alimento mais adequado para esse uso ainda serão testados.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thiphymurium*, plantas aromáticas, antimicrobianos naturais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Elementos do metabolismo primário e a inter-relação com o metabolismo secundário. Adaptado de GARCIA e CARRIL, 2009	16
Figura 2. Estrutura química do A) Linalol e B) Geraniol.	24
Figura 3. Rota fecal-oral na transmissão de patógenos. Adaptado de: JAY, 2005	27
Figura 4. Publicações ao redor do mundo sobre atividade antimicrobiana de produtos naturais. Fonte: DUARTE, 2006	29
Figura 5. Publicações por região. NA= América do Norte; LA= América Latina, Brasil em branco; AF= África; EU= Europa; AS=Ásia; OC= Oceania. Fonte: DUARTE, 2006	29
Figura 6. Folhas da espécie <i>Ocimum basilicum</i> L	32
Figura 7. Ilustração do procedimento de difusão em ágar	34
Figura 8. Ilustração do procedimento para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do óleo essencial dos cultivares utilizados neste estudo (PINTO, 2017).....	33
Tabela 2. Espectro de atividade antibacteriana dos óleos essenciais de 7 cultivares de <i>Ocimum basilicum</i> L	37
Tabela 3. Concentração inibitória mínima do óleo essencial de cada cultivar frente às bactérias testadas	38
Tabela 4. Dose Bactericida Mínima (DBM) do óleo essencial de cada cultivar para as bactérias testadas	40
Tabela 5. Efeito do óleo Mrs. Burns e Maria Bonita nos parâmetros de crescimento de <i>S. aureus</i>	41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Plantas aromáticas	13
3.1.1	Composição das plantas aromáticas e medicinais.....	15
3.2	Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários	18
3.2.1.1	Sazonalidade, ciclo circadiano e desenvolvimento.....	18
3.2.1.2	Temperatura	20
3.2.1.3	Disponibilidade hídrica.....	20
3.2.1.4	Nutrientes	21
3.3	Óleos essenciais.....	22
3.4	Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> L.....	24
3.5	Patógenos em alimentos.....	26
3.6	Utilização de óleos essenciais como conservante natural em alimentos	30
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Material vegetal.....	32
4.2	Microrganismos e condições de cultivo	33
4.3	Espectro de atividade do óleo essencial	34
4.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) do óleo essencial.....	34
4.5	Efeito do óleo essencial no crescimento dos microrganismos	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Espectro de atividade do óleo essencial	37
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) do óleo essencial.....	38
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os avanços nas tecnologias de conservação de alimentos foram notáveis, entretanto, mesmo com estes avanços, a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos ainda são comuns (HU *et al.*, 2016). Estima-se que as doenças diarreicas veiculadas por alimentos já causaram aproximadamente 4 a 6 milhões de mortes por ano, com a maioria delas ocorrendo em crianças pequenas (WHO, 2003). Dados mais recentes registrados no Brasil mostraram que 90,5% dos casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2007 a 2016 foram ocasionados por bactérias (Ministério da Saúde, 2016). Além disso, a contaminação de alimentos por microrganismos também repercute em perdas econômicas para a indústria alimentícia (SWANGER e RUTHERFORD, 2004).

Nesse sentido, o estudo de agentes antimicrobianos potentes para a conservação e manutenção da segurança microbiológica de alimentos é importante. Os primeiros conservantes de alimentos adotados em larga escala na indústria foram os aditivos químicos, apresentando algum nível de toxicidade a depender da quantidade utilizada. Além disso, esses conservantes também interferem nas características nutricionais e organolépticas do produto (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Posteriormente, com mais estudos na área de biotecnologia, implementou-se a utilização de substâncias naturais como conservantes (PEREIRA *et al.*, 2006), visando garantir a qualidade microbiológica do alimento, sem representar risco para saúde do consumidor ou interferir nas características organolépticas (ELSSER-GRAVESEN, 2013; ZHANG *et al.*, 2016).

Dentre os antimicrobianos de origem natural mais promissores que tem sido pesquisados podemos citar os óleos essenciais extraídos de plantas (ZHANG *et al.*, 2016; EVRENDILEK, 2015; CHEN *et al.*, 2016; LUÍS *et al.*, 2016; SIROLI *et al.*, 2015). Estes compostos possuem potencial antioxidante e antimicrobiano e vários estudos têm descrito seu potencial para aumentar a vida de prateleira dos produtos sem potenciais riscos para o consumidor ou interferência nas características naturais do alimento (TAJKARIMI *et al.*, 2010; SOLORZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

O óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) é reconhecido como seguro (GRAS), pois já faz parte da dieta humana desde a antiguidade (FDA, 2016). Além da conservação de alimentos, o manjerição também apresenta várias outras aplicações como: uso medicinal, condimentar, ornamental, além de ser utilizado pela indústria de alimentos como aromatizante (AL ABBASY *et al.*, 2015). O manjerição pode ser encontrado facilmente em várias regiões do mundo e possui grande valor econômico devido à sua vasta aplicabilidade (AQUINO *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de sete cultivares de manjerição (*Ocimum basilicum* L.), foi testada frente a bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, sendo elas: *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cultivares da espécie *Ocimum basilicum* L. contra bactérias patogênicas e deterioradoras relacionadas a alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o espectro de atividade do óleo essencial contra bactérias patogênicas e deterioradoras relacionadas a alimentos;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) do óleo essencial dos cultivares para as bactérias em estudo;
- Verificar o efeito do óleo no crescimento dos microrganismos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas aromáticas

As plantas aromáticas, também conhecidas como plantas medicinais que produzem compostos bioativos, geralmente essências, têm aromas característicos capazes de impactar o olfato de forma positiva sendo extensamente distribuídas por todo o mundo e utilizadas por diversas sociedades e etnias, como condimentos, especiarias, antiespasmódico, anti-inflamatório, antimicrobiano, molhos, aromatizante, dentre outros fins, através dos saberes populares que são passados de geração em geração, constituindo a etnobotânica (RODRIGUES *et al*, 2006; CORREA JÚNIOR *et al.*, 1994; CUNHA *et al.*, 2009).

A partir destes usos, têm-se desenvolvido várias pesquisas com estas plantas para a comprovação científica de sua eficiência, com muito interesse pelas farmácias de manipulação e indústrias alimentícias, evidenciando um mercado favorável (AL ABBASY *et al.*, 2015; HOMMA, 2012). Segundo BRAGA (2011) em um dos herbários mais antigos do mundo localizado no Egito há a descrição de 125 plantas medicinais e 811 receitas utilizadas pelos egípcios. Por mais que seu uso seja feito há muito tempo pelas diversas sociedades do mundo, deve-se ter o devido cuidado para que não sejam tóxicas ao invés de terapêuticas (DELATORE, 2010).

Além do benefício medicinal, as plantas aromáticas são fundamentais para a economia mundial, movimentando bilhões de dólares em países desenvolvidos e em desenvolvimento (SKELLY, 1996). Segundo GUERRA e NODARI (2003) dos US\$ 8 bilhões de lucro da indústria farmacêutica nacional, 25% resultam de medicamentos produzidos a partir das plantas medicinais. Diante da sua notória importância, após a década de 80, surgem resoluções, portarias e relatórios. A Portaria nº 212/1981 do Ministério da Saúde, aborda no seu item 2.4.3, o estudo das plantas medicinais uma das prioridades da investigação clínica; O Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais na Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, em 1982, delineou a relevância terapêutica utilizando-se de plantas medicinais com embasamento científico.

No Brasil, detentor da maior diversidade genética vegetal do mundo, há várias famílias botânicas, e as que mais incidem na Amazônia são: Rutaceae,

Burseraceae, Anacardiaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae, dentre outras, evidenciando a grande importância de cada uma, que é utilizada há muito tempo pelos índios no ritual de aromaterapia, alimentação. (BARATA, 2012; MAIA & ANDRADE, 2009).

A *Murraya paniculata* (murta-de-cheiro), foi introduzida no Brasil e é originalmente nativa da Índia, pertencente à família Rutaceae. Pode ser encontrada como ornamentação nos Jardins de São Paulo, e em países da Ásia e na China é utilizada medicinalmente para problemas medicinais. De acordo com MESQUITA *et al.*, 2008, do ponto de vista da composição química, esta planta concentra principalmente flavonóides, alcaloides, derivados do ácido cinâmico, cumarinas, porém, na separação cromatográfica de extratos da sua folha, foi possível observar pela primeira vez neste gênero, 24-metileno-cicloartan-3 β -ol e cafeato de metila como substâncias isoladas, e somente a cumarina apresentou atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Outro exemplo bem conhecido de planta aromática é a *Curcuma longa* L., pertencente à Família Zingiberaceae, popularmente conhecida como açafrão da Índia, açafrão-da-terra, dentre outros, a depender da região geográfica em análise. Nativa do sudeste da Ásia foi introduzida no Brasil e pode ser encontrada em vários estados. É muito relatada na literatura com seu uso principal sendo como tempero, mas também há propriedades medicinais como estomáquico, expectorante, estimulante, anti-inflamatório, anti-helmíntico e dermatológico (CECILIO FILHO *et al.*, 2000).

A família Lamiaceae, incluída na Ordem Lamiales, é constituída por aproximadamente 200 gêneros possuindo inúmeras espécies conhecidas pelo uso condimentar, antimicrobiano, antifúngico, analgésico, digestivo, entre outros (LIMA *et al.*, 2013; DUARTE, 2006; LACHOWICZ *et al.*, 1998). A espécie *Ocimum basilicum* L., conhecida popularmente como Manjerição, apresenta várias aplicações como as citadas acima, mas também como fungicida, acaricida, e é bastante utilizada como aromatizante (YÁ NEZ *et al.*, 2014; AL ABBASY *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2009).

Os países desenvolvidos são os maiores produtores de drogas e remédios à base de plantas medicinais e aromáticas, sendo um mercado promissor e que gera muito lucro às indústrias farmacêuticas. ROOSTA, MOGHADDASI e HOSSEINI (2017) calcularam alguns índices para inferir quais os países mais competidores e

importadores de plantas aromáticas e medicinais (PAM) de 2000 a 2014. Eles puderam observar que nenhum país atua sem a participação de outros países e que dentre os 28 países analisados, a China e os EUA possuem a maior parcela de importância, com enorme destaque de mercados-alvo.

3.1.1 Composição das plantas aromáticas e medicinais.

As plantas produzem várias substâncias essenciais para o seu estabelecimento. Os metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídeos) estão diretamente relacionados com o crescimento, desenvolvimento e reprodução, referentes à fotossíntese, transporte de nutrientes, respiração, fotorrespiração, crescimento celular, dentre outros, fundamentais para todas as plantas (GARCIA e CARRIL, 2009); Os metabólitos secundários, não são produzidos por todas as plantas e são constituídos por substâncias bioativas, ou seja, possuem ação no organismo, estão relacionados com respostas a estímulos ambientais, como repelente contra o ataque de herbívoros, proteção contra raios ultravioleta, mecanismo de alelopatia impedindo a competição de nicho por outras plantas, contra microrganismos e outros patógenos (GARCIA E CARRIL, 2009).

Processos envolvidos no metabolismo primário estão inter-relacionados com o metabolismo secundário (Figura 1), servindo como base para a produção de compostos, como: fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides, terpenos e esteroides (GARCIA e CARRIL, 2009).

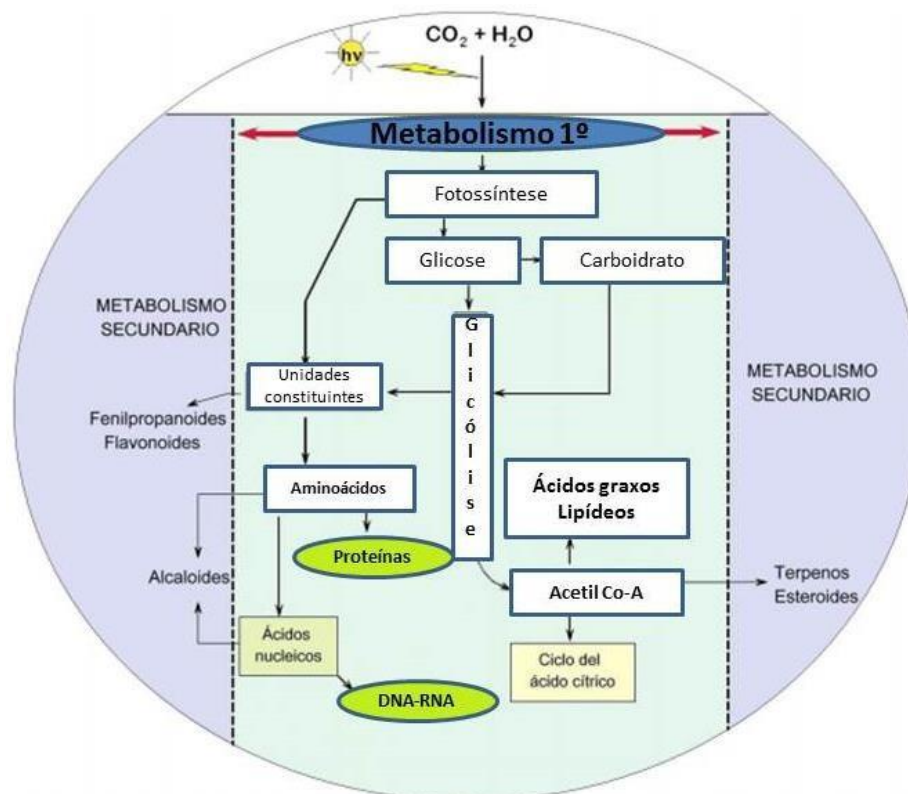


Figura 1. Elementos do metabolismo primário e a inter-relação com o metabolismo secundário.

Adaptado de GARCIA e CARRIL, 2009.

Os metabólitos secundários foram descritos inicialmente, em Biologia, por KOSSEL 1891 *apud* FUMAGALI *et al.*, 2008, definindo-os como contrários aos metabólitos primários, pois estão em pequena quantidade e em órgãos, como as folhas, ou células típicas das plantas. As moléculas principais são os compostos fenólicos, alcalóides e compostos terpênicos. Segundo FUMAGALI *et al.*, 2008, os compostos fenólicos estão relacionados com a produção de lignina, fundamental para as plantas superiores, possuindo coloração e cheiro agradáveis tanto para os seres humanos quanto para possíveis polinizadores, atraídos inicialmente pela cor.

Os compostos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina e taninos), são caracterizados por apresentarem o fenol em sua constituição, ou seja, um anel aromático ligado a uma hidroxila (OH), indo desde moléculas mais simples, como os ácidos fenólicos, até as mais complexas como a lignina e os taninos. A grande maioria destes compostos é derivada do aminoácido aromático fenilalanina (GARCIA e CARRIL, 2009). De acordo com a literatura, as cumarinas atuam como antimicrobianos e inibidores da germinação de plântulas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). É de grande importância saber a constituição das plantas aromáticas, visto que seu

uso é muito vasto, desde o uso medicinal em sociedades diversas, bem como pela indústria de alimentos, farmacêuticas, entre outras. De acordo com uma revisão feita por COSTA *et al.*, 2015, eles enumeraram vários compostos fenólicos – Luteolina, Ácido gálico, Ácido clorogênico– , propriedades físicas e químicas, o tipo de composto utilizado para extração destes compostos e evidencia que o melhor solvente em extração de compostos fenólicos em *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Salvia officinalis* (sálvia) é o metanol. Saber a composição e o melhor método de extração é fundamental e influencia na quantidade e frequência extraída de plantas aromáticas.

Os alcaloides possuem como características marcantes serem solúveis em água, no mínimo um átomo de Nitrogênio na molécula e apresentarem atividade biológica, estando presentes em aproximadamente 20% das plantas superiores. Eles interagem com os neurotransmissores, gerando respostas fisiológicas e psicológicas em seres humanos. Um dos alcaloides pioneiros a ser descoberto foi o Ópio obtido de extrato de *Papaver somniferon*, constituído por vários outros alcaloides, a exemplo da Morfina e Codeína, extensamente utilizadas em tratamentos (GARCIA e CARRIL, 2009; DINIS-OLIVEIRA 2014).

Os compostos terpênicos são o grupo mais significativo em números, sendo constituído tanto por metabólitos primários (essenciais para o crescimento e sobrevivência da planta) quanto por metabólitos secundários. A exemplo de metabólitos primários pode-se citar os fito hormônios (giberelina, ácido abscísico e citoquininas), carotenoides, e clorofilas. Todos derivam de unidades de isopreno (cinco átomos de Carbono), geralmente são insolúveis em água e podem ser classificados em (GARCIA e CARRIL, 2009):

- Monoterpenos: são terpenos de 10 Carbonos, possuem duas unidades de isopreno;
- Sesquiterpenos: são terpenos de 15 Carbonos, possuem três unidades de isopreno;
- Diterpenos: são terpenos de 20 Carbonos, possuem quatro unidades de isopreno;
- Triterpenos: são terpenos de 30 Carbonos;
- Tetraterpenos: são terpenos de 40 Carbonos;

- Politerpenos: são terpenos que contém mais de oito unidades de isopreno, ou seja, acima de 40 Carbonos.

Com relação aos metabólitos secundários, podemos citar os óleos essenciais, produzidos por plantas aromáticas e medicinais, que são responsáveis pelo aroma característico de cada espécie e geralmente são classificados como monoterpenos. (GARCIA e CARRIL, 2009).

3.2 Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários.

As plantas como um todo, precisam de condições mínimas para que possam executar suas funções fisiológicas e metabólicas. Além dos micronutrientes, requeridos em menor quantidade, e dos macronutrientes, requeridos em maior quantidade pelas plantas, há vários fatores que podem influenciar na quantidade de metabólitos produzidos (KIRKBY e RÖMHELD, 2007). Há outros fatores abióticos que também podem influenciar nas concentrações de metabólitos secundários, como sazonalidade, ciclo circadiano, desenvolvimento e idade da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, luminosidade (GOUVEA *et al.*, 2012; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; MORAIS, 2009).

3.2.1.1 Sazonalidade, ciclo circadiano e desenvolvimento.

A sazonalidade está relacionada com características temporárias típicas de cada estação do ano, como o clima, precipitação, incidência de raios solares, dentre outros. Vários estudos relatam que a época em que estes metabólitos, a exemplo dos óleos essenciais, flavonóides, ácidos fenólicos, alcaloides, taninos, dentre outros, são coletados, pode interferir na composição e quantidade destes metabólitos (MORAIS, 2009; GOBBO-NETO e LOPES 2007).

De acordo com o estudo de PÉREZ *et al.*, 2004, que estudou 10 populações de *Digitalis obscura*, conhecida popularmente como Dedaleira, pôde inferir que a concentração de cardenolídeos variou no tempo das estações do ano como uma

resposta ambiental da planta, onde houve menor quantidade encontrada na primavera, acumulação maior no verão, diminuição no outono e estagnação no inverno.

Além disso, há vários estudos relatando que os metabólitos secundários como os óleos essenciais podem variar a concentração de seus componentes a depender do horário. Estudo feito com folhas de *Myrcia salzmannii* Berg. coletadas em meses variados de 2001 a 2003, demonstrou que houve variação qualitativa na composição do óleo essencial, em que o β -cariofileno, principal constituinte do óleo em análise, em Fevereiro de 2001 correspondia a 41,5% e em Outubro do mesmo ano esteve na concentração de 24,1% (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

Estas variações geralmente estão relacionadas ao estresse ambiental, visto que cada época do ano apresenta características típicas. BRANT *et al.* (2008) observaram que a taxa de óleo essencial de folhas secas de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton foram estatisticamente diferentes, e o mês de Abril de 2004 obteve a maior quantidade. Tais características são notáveis por conta das necessidades emergenciais da planta. A depender das condições, as plantas podem direcionar a economia energética armazenada para o metabolismo primário, visto que estes são essenciais para elas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Estes fatores além de ser analisados isoladamente na produção variável de metabólitos secundários, também podem ser vistos em conjunto, como sazonalidade e desenvolvimento, ciclo circadiano e disponibilidade hídrica. Tecidos jovens das plantas possuem alta atividade para produção de compostos, e por isso, a idade e o desenvolvimento da planta podem influenciar na quantidade produzida e proporção dos compostos analisados (MORAIS, 2009).

DE OLIVEIRA *et al.*, 2015, verificaram que na espécie *Mentha x piperita* var. *citrata* há influência da idade da planta e quantidade de metabólitos secundários. Na idade juvenil, apresentou quantidades baixas de óleos essenciais, e quando a planta já estava na fase de senescência, os níveis foram os menores registrados, evidenciando a redução dos processos biossintéticos.

3.2.1.2 Temperatura

Outra importante variável que influencia o estabelecimento e crescimento das plantas é a temperatura, tanto do ar como a do solo. Temperaturas que vão desde o frio extremo até o calor máximo podem desencadear respostas diferentes nas plantas, como forma de manterem-se em equilíbrio. Temperaturas altas agem diretamente sobre a abertura estomática, ficam fechados por mais tempo para evitar a perda de água (transpiração), e impacta negativamente a fotossíntese, essencial para o crescimento normal da planta (VERMA e SHUKLA, 2015).

A maioria das plantas possui adaptações através da Evolução para se estabelecerem no ambiente. Há vários gradientes de distribuição, e um dos mais amplamente conhecidos é de acordo com a latitude, em que as maiores possuem uma menor riqueza de espécies devido a limitação de recursos e temperaturas muito baixas. De acordo com CHINNUSAMY e ZHU, 2007 temperaturas mínimas, abaixo de 20°C, dificultam a absorção de água e nutrientes, interfere na fluidez da membrana plasmática, diminui as reações bioquímicas, a estrutura tridimensional das proteínas e ocorre, indiretamente, reprogramação da expressão de genes.

3.2.1.3 Disponibilidade hídrica

As plantas, assim como todos os seres vivos, necessitam de água para o seu crescimento e desenvolvimento. Ela participa de todas as reações fisiológicas e sua diminuição pode acarretar na redução do tamanho total, menores números de folhas, floração atrasada, amadurecimento reprodutivo tardio, influencia diretamente na fotossíntese por conta da abertura estomática limitada, entre outros (MORAIS, 2009; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Vários aspectos que possam afetar processos que envolvam o metabolismo primário – crescimento, fotossíntese – afetam direta ou indiretamente a produção de metabólitos secundários. A água, sendo uma molécula fundamental à vida e ao conjunto de transformações químicas das plantas, acredita-se que locais com maior teor de umidade favoreça uma maior produção de metabólitos secundários, mas às vezes este não é o observado (MORAIS, 2009; BORTOLO *et al.*, 2008). De acordo

com BORTOLO *et al.*, 2008, o excesso de água gerou efeitos negativos na produção de princípios ativos, e aquelas que tiveram estresse hídrico em algumas fases de cultura, forneceram maiores quantidades de substâncias do metabolismo secundário, possibilitando defesas contra patógenos para a planta.

Um estudo feito com *Melaleuca alternifolia* Cheel, com diferentes tratamentos de irrigação, observou-se que as plantas do Tratamento 2 (irrigação diária de 1L de água) ocasionou o maior crescimento em altura da planta quando comparado ao tratamento 1 (irrigação diária de 0,5L de água). Atrelado a isto, observou-se também que as plantas que apresentaram maiores tamanhos em altura e de ramos (Tratamento 2) também produziram maiores quantidades de óleo essencial. As plantas com maior estresse hídrico (Tratamento 1) obtiveram a menor quantidade de óleo essencial devido à redução de biomassa seca, mas não influenciando na composição final do óleo (SILVA *et al.*, 2002).

3.2.1.4 Nutrientes

Grande parte dos elementos indispensáveis para as plantas, como os macronutrientes e micronutrientes, advém dos minerais presentes em rochas, com exceção do Nitrogênio, a partir disto, o estudo da nutrição das plantas é conhecido como nutrição mineral (COSTA, 2014). Um breve histórico, nos mostra que a agricultura surgiu há muito tempo às margens dos rios, quando os homens deixam os hábitos nômades para se tornarem sedentários, pois eram locais com grande disponibilidade de água (FABER, 2013).

Os macronutrientes são assim denominados por serem requeridos em maiores concentrações de matéria seca pela planta [$\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$]. Também são conhecidos como elementos essenciais, pois são componentes intrínsecos para reações que ocorrem na planta, e sua ausência gera anormalidades em etapas do metabolismo primário, são eles o Nitrogênio (N), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Fósforo (P) e Enxofre (S) (SALISBURY e ROSS, 1992 *apud* COSTA, 2014).

Os micronutrientes, por sua vez, são requeridos em menores concentrações de matéria seca pela planta [$\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$], são eles Níquel (Ni), Cloro (Cl), Boro (B), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn), Cobre (Cu) e Molibdênio (Mb) (SALISBURY e ROSS, 1992 *apud* COSTA, 2014). O crescimento da planta, portanto, deve

obedecer a Lei do Mínimo de Sprengel-Liebig (1855), que diz que o crescimento da planta é restringido ao elemento que se encontra menos abundante entre todos os elementos necessários no solo (FRANCO *et al.*, 2008).

Visto a grande notabilidade dos macro e micronutrientes para a planta, alterações em suas quantidades afetam não somente o metabolismo primário, mas também o metabolismo secundário. Estudos mostram que plantas pobres em nutrientes apresentam maior quantidade de metabólitos secundários, a exemplo dos compostos fenólicos (DUSTIN, 1992), mas esta hipótese de relação não foi absolutamente corroborada. O Nitrogênio, elemento requerido em maior quantidade dentre os macronutrientes, a sua maior disponibilidade no solo aumenta a produção de metabólitos como alcaloides e glicosídeos (HÖFT, VERPOORTE, e BECK, 1996).

3.3 Óleos essenciais

O uso de plantas medicinais e dos seus óleos essenciais acompanha a história da humanidade, sendo utilizado ao longo da história para diversos fins, como para a alimentação, perfumaria e tratamento terapêutico (FRANZ, 2010; LUBIAN *et al.*, 2010). Atualmente são de grande importância na síntese de cosméticos e para a indústria farmacêutica e alimentícia, surgindo também como alternativa à substituição de produtos sintéticos artificiais (PORTO, 2010; OKOH *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais são compostos orgânicos e voláteis, extraídos de várias plantas aromáticas, correspondendo a metabólitos secundários que não estão diretamente associados ao crescimento e desenvolvimento da planta. São constituídos por vários elementos, em grande parte por terpenos, substâncias voláteis, geralmente apresentando aparência oleosa em temperatura ambiente (DE MORAIS, 2009). Os terpenos apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH *et al.*, 2007; BAJPAI *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2008). Grande parte dos óleos essenciais - estando eles contidos em inflorescências, flores, folhas, raízes, rizomas, frutos, sementes ou caules - pode ser obtida através das técnicas de hidrodestilação, destilação a vapor, agitação sólido-líquido, extração de fluido pressurizado, extração ultrassônica (COSTA *et al.*, 2015).

A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a cultivar e fatores ambientais, no entanto normalmente estão presentes compostos como: linalol, 1,8 cineol e eugenol (AQUINO *et al.*, 2010; BARCELOS *et al.*, 2013). Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), alguns compostos majoritários podem ter seu acúmulo alterado em função do ritmo circadiano, ou seja, variações que ocorrem ao longo do dia. Segundo SOARES *et. al.* (2007), os óleos essenciais e o Linalol de *Ocimum basilicum* L. também sofrem influências devido à temperatura e velocidade de secagem das folhas.

Vários estudos comprovam que os óleos essenciais apresentam ação antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena e antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar (WANNES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2010; VALERIANO *et al.*, 2012; DRA *et al.*, 2017). Segundo OLIVEIRA *et al.* (2016), a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais deve-se, principalmente, ao dano causado à integridade da membrana da bactéria por conta dos componentes lipofílicos do óleo, afetando a manutenção do pH intracelular, ocasionando desequilíbrio para a célula bacteriana. Esses autores ainda ressaltam que a probabilidade dos microrganismos sensíveis desenvolverem resistência aos óleos essenciais é rara.

Um dos fatores que contribui para o interesse no estudo dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos está relacionado ao surgimento de várias estirpes patogênicas resistentes aos antibióticos convencionais e também pela necessidade em restringir o uso de conservantes químicos sintéticos em alimentos devido ao seu potencial carcinogênico (RAUHA *et al.*, 2000; VALERIANO *et al.*, 2012).

CARVALHO *et al.*, 2017, estudando o efeito do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) NE Brown, e seus principais constituintes - citral e limoneno – no músculo liso traqueal de ratos com massa corpórea de aproximadamente 200-300 gramas na Universidade Federal do Ceará, puderam observar que houve o relaxamento do músculo liso e que há efeito antiespasmódico gerado pelo citral, componente encontrado em maior quantidade no óleo estudado.

3.4 Óleo essencial de *Ocimum basilicum* L.

A planta *Ocimum basilicum* L. é pertencente à família Lamiaceae, sendo cosmopolita e encontrada em diversos locais do mundo, também com vasta distribuição pelo país. Esta família tem como característica a presença de espécies que possuem fins medicinais, aromáticos, condimentares, alimentícios, dentre outros. Os óleos essenciais encontrados em plantas aromáticas são, em sua grande maioria, compostos por derivados de terpenos resultantes do metabolismo secundário (COUTINHO *et al.*, 2015). AQUINO *et al.*, 2010, analisaram a composição química de *Ocimum basilicum* L., através de cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa, e identificaram 13 compostos, sendo os mais abundantes o Linalol (71,88%) e Geraniol (13,66%). Como visto em vários trabalhos, o composto majoritário encontrado em grande quantidade no óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. é o Linalol (NETO *et al.*, 2017; SAKKAS, 2017; AQUINO *et al.*, 2010).

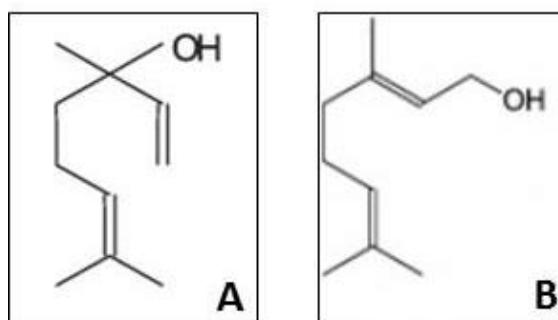


Figura 2. Estrutura química do A) Linalol e B) Geraniol.

O Linalol (Figura 2.A) é um álcool, monoterpeneo e uma revisão da literatura feita de 2000 a 2014 (CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2015) enumera seus efeitos biológicos, tais como: sedação e anestesia em peixes, efeito antimicrobiano, controle de vetores da Malária, anti-inflamatório, analgésico, entre outros. ALVIANO *et al.*, 2005, mostrou que o Linalol inibiu todos os microrganismos de saliva humana que tinham sido inibidos também pela clorexidina, possuindo efeito antifúngico contra a

candidíase e no crescimento micelial de *Trichophyton rubrum* (DE OLIVEIRA LIMA *et al.*, 2017). SOKOVIĆ *et al* 2010, avaliou o efeito inibitório mais satisfatório contra bactérias Gram-positivo do que as Gram-negativo.

O Geraniol (Figura 2.B) é um álcool, monoterpeneo, acíclico e possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Por ser hidrofóbico, adere aos lipídios da membrana celular destruindo as estruturas e tornando-as permeáveis, permitindo a sua entrada na célula bacteriana (COUTINHO *et al.*, 2015; YUE *et al.*, 2017). SHARMA, 2016, demonstrou ainda que possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* interrompendo a integridade da membrana celular, interferindo na síntese de ergosterol e inibindo a PM-ATPase.

Vários estudos têm demonstrado aplicação do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L.. SOUZA, 2017, demonstrou a utilização eficaz do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. e *Cymbopogon flexuosus* como anestésico e sedativo em juvenis de Tilápia do Nilo, como forma de facilitar o transporte e reduzir a manipulação e a aparição de doenças. O composto encontrado em maior quantidade no óleo de *Ocimum basilicum* L. foi o Linalol (53,35%) e no *Cymbopogon flexuosus* foi o Geraniol (50,13%). RODRIGUES *et al*, 2017, observaram que o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. possui ação contra inflamação aguda e crônica em camundongos, impedindo a formação de edemas, podendo ser utilizado em sinergia com β -ciclodextrina (β -CD) na fabricação de fármacos anti-inflamatórios.

Alguns estudos também têm testado o óleo do manjeriço em alimentos. LACHOWICZ *et al.*, 1998, utilizou 5 variedades em suco de tomate, possuindo efeito positivo contra bactérias Gram-positivo (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Sarcina* sp., *Lactobacillus* sp.) e bactérias Gram-negativo (*Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.), evidenciando o Linalol e metil-chavicol como essenciais na atividade antimicrobiana. A utilização destes óleos em alimentos contra bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos é de grande importância, por possuírem atividade inibitória, podendo substituir os aditivos químicos que causam efeitos colaterais (SOLÓRZANO, 2012; LACHOWICZ *et al.*, 1998; BARBOSA *et al.*, 2015).

Mais recentemente, OZDIKMENLI e DEMIREL (2016), testaram o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. contra linhagens de *Salmonella* sp. em carne moída. O óleo essencial foi testado nas concentrações de 20 µg/mg e 10 µg/mg e nas duas condições o número de células viáveis diminuiu consideravelmente. Entretanto, na concentração maior houve alteração nas características organolépticas do produto. Alguns trabalhos também têm testado o uso do óleo de *Ocimum basilicum* L. como componente de filmes comestíveis ou biodegradáveis para o acondicionamento de alimentos (SUPPAKUL *et al.*, 2003; RIVEROS *et al.*, 2016).

3.5 Patógenos em alimentos

Com a criação e produção de alimentos preparados, começa a aparição de transmissão de doenças ocasionadas por microrganismos, muitas vezes ocasionada pela manipulação incorreta. Há doenças que só podem ser contraídas através da ingestão de alimentos contaminados, como o botulismo e a intoxicação estafilocócica (JAY, 2005). As doenças transmitidas por alimentos (DTA), doenças veiculadas por alimentos (DVA) ou toxinfecções são assim classificadas quando várias pessoas ingerem alimentos contaminados por microrganismos ou toxinas produzidas por estes e que apresentam sintomas semelhantes, mas há ainda as que necessitam apenas de um caso notificado para ser categorizada como DTA, a exemplo da *Escherichia coli* e *Clostridium botulinum* (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Uma das características das DTA é que grande parte dos alimentos ingeridos que as ocasionam estão com cor, cheiro e aparência agradáveis, pois os consumidores acreditam que se trata de alimentos próprios para o consumo. Um estudo feito utilizando análise de reação em cadeia polimerase (PCR) com amostras de carne bovina, de ovelhas e de frango processadas, mostrou a presença de *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* em 79%, 86% e 94%, respectivamente. Em amostras de carne também foram encontradas *E. coli* e *Salmonella entérica* nas concentrações respectivas de 90% e 91% (AKYOL, 2018).

Grande parte das DTA são propagada através da via fecal-oral, com exceção das micotoxinas, toxinas botulínicas e do fitoplâncton. Geralmente, essa transmissão é feita a partir de manipuladores de alimentos, que não fazem a devida higienização satisfatória, a seguir podemos observar a rota de contaminação fecal-oral (Figura 3.) segundo JAY, 2005. Isto é ainda mais alarmante em países subdesenvolvidos, como países da África. PAUDYAL *et al.*, 2017, estudaram quais os patógenos mais encontrados nos alimentos em sete países da África (Gana, Benin, Sudão, Uganda, Botswana, Nigéria e Quênia) entre 2000 e 2015 e constataram a grande presença em alimentos crus e preparados e obtiveram como resultado a ocorrência de *Enterobacter sp.*, *E. coli* (maior frequência : 37,6% em alimentos crus), *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*.

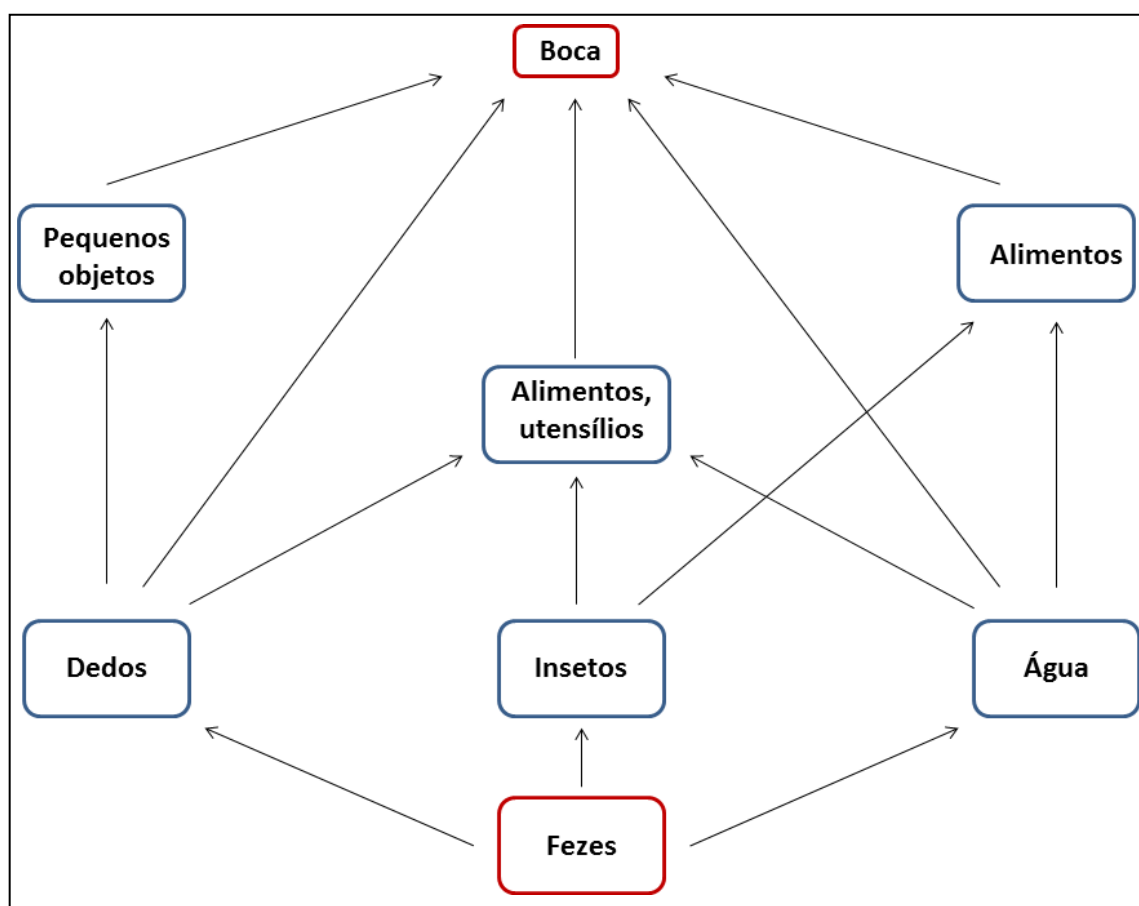


Figura 3. Rota fecal-oral na transmissão de patógenos. Adaptado de: JAY, 2005.

Atrelado a isto, surge a necessidade de maior fiscalização, higiene e segurança, tanto em alimentos crus como em preparados. A mudança no estilo de

vida mostra que cada vez mais as pessoas estão adotando hábitos alimentares mais saudáveis, como os alimentos crus (PINU, 2016). Em relação a este assunto, a Resolução CONAMA nº 20 de 1986, expõe as classes da água com sua devida destinação. As classes relacionadas à frutas e hortaliças estão dispostas no tópico água doce, classes 1 e 2. A classe 1 aborda a utilização desta água para irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e frutas que se desenvolvem próximas ao solo, sendo ingeridas cruas sem retirada do epicarpo (casca). A classe 2 fala sobre a necessidade de irrigação de plantas frutíferas e hortaliças com água potável (CONAMA, 1986).

Devido ao grande risco de contaminação através dos alimentos, e a grande resistência de bactérias a antibióticos, surge a necessidade e interesse da adição de agentes antimicrobianos naturais em alimentos, como forma de mitigar os casos de DTA e manter a segurança microbiológica e aumentar o tempo de prateleira do alimento (ATARÉS, CHIRALT, 2016). KING; KANG, 2017, testaram a combinação do aquecimento óhmico com vários componentes de óleo essencial para inativar patógenos transmitidos por água de peptona tamponada e salsa. Eles utilizaram o citral, carvona eugenol e timol em sinergismo com o aquecimento, e observaram que o melhor rendimento de efeito bactericida foi com o citral em *E. coli*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*.

De acordo com a comprovação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, o número de pesquisas na área só aumenta, expondo a grande importância no ramo. Uma revisão feita em 2006 mostra a quantidade de pesquisas feitas ao redor do mundo (Figura 4) e por região (Figura 5) para investigar compostos ativos antimicrobianos presentes em plantas aromáticas (DUARTE, 2006).

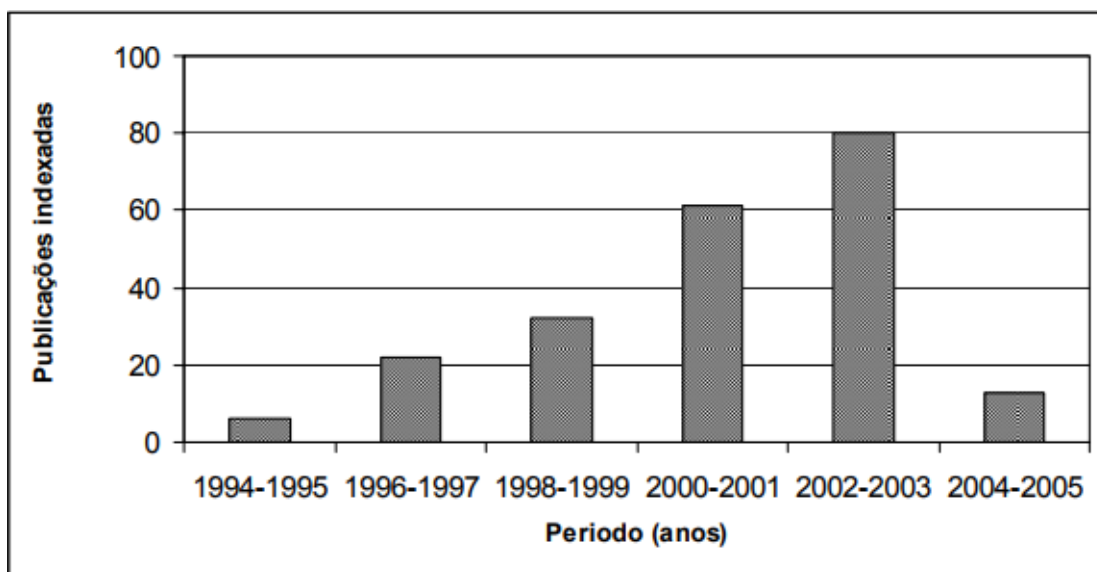


Figura 4. Publicações ao redor do mundo sobre atividade antimicrobiana de produtos naturais. Fonte: DUARTE, 2006.

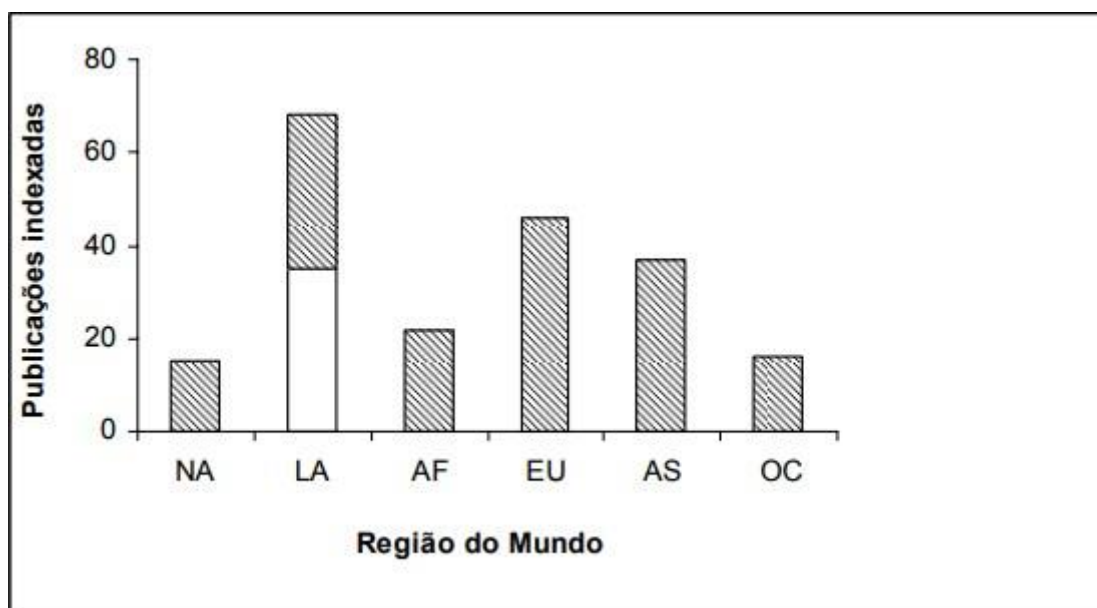


Figura 5. Publicações por região. NA= América do Norte; LA= América Latina, Brasil em branco; AF= África; EU= Europa; AS=Ásia; OC= Oceania. Fonte: DUARTE, 2006.

3.6 Utilização de óleos essenciais como conservante natural em alimentos

Em virtude das suas propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais têm sido pesquisados para a conservação de diversos alimentos. Essas substâncias naturalmente encontradas na natureza não só preservam as propriedades organolépticas do produto, como também asseguram a qualidade microbiológica do mesmo, aumentando, assim, sua segurança e vida de prateleira (TRAJANO et al., 2009). As vantagens da utilização dos óleos essenciais na conservação de alimentos são: atividade antimicrobiana contra várias bactérias patogênicas encontradas em alimentos (BERTINI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2007; AQUINO et al., 2010); compostos naturais encontrados em plantas com ampla distribuição nacional (TRAJANO et al., 2009); dificilmente ocorrerá a seleção de linhagens resistentes (OLIVEIRA et al., 2016).

Vários estudos têm demonstrado o potencial de óleos essenciais na conservação de alimentos. MENDONÇA, 2005, demonstrou a ação antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos de cravo da Índia, manjerição e orégano contra *Staphylococcus aureus* em queijo ricota. ESPINA et al., 2012, propôs a utilização de um procedimento combinado entre um tratamento térmico brando e óleos essenciais para a preservação de sucos de frutas, o que resultou na diminuição nos custos de produção e aumento da qualidade nutricional e sensorial do produto. Em um estudo realizado por SOUZA et al., 2013a, aplicação de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra *Pseudomonas fluorescens* em caldo de legumes, resultou na perda de viabilidade das células. O óleo causou ruptura da membrana citoplasmática levando, assim, à perda de substâncias intracelulares e encolhimento celular e, conseqüentemente, morte celular, demonstrando a eficácia citotóxica contra tais patógenos.

Dentre as alternativas para a aplicação do óleo essencial em alimentos estão o uso em embalagens ativas e encapsulados em polímeros de revestimentos comestíveis e biodegradáveis que proporcionam uma liberação lenta para a superfície do alimento (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Outra recomendação envolve o encapsulamento dos óleos essenciais em nanoemulsões aumentando a estabilidade dos componentes voláteis, protegendo da interação com a matriz do

alimento e aumentando a atividade antimicrobiana devido ao aumento da absorção celular passiva (DONSÍ et al., 2011).

O emprego de óleos essenciais associados a embalagens e filmes para o acondicionamento de alimentos tem ganhado grande destaque pelo fato de aumentar a vida útil dos mesmos, torná-los mais saudáveis e atrativos, já que a interação química com os polímeros de celulose provoca uma difusão lenta dos agentes antimicrobianos para a superfície dos produtos (MONTES *et al.*, 2014; MATTEI *et al.*, 2013). Vários experimentos comprovam tal utilidade, como o desenvolvimento de filmes à base de alginato e adicionados ao óleo essencial de alho exibiram atividade antimicrobiana satisfatória, assim como filmes com amido acetilado, gelatina e plastificante impregnados com óleos essenciais de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* (MATTEI et al., 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

Nesse trabalho, foram utilizados óleos essenciais de sete cultivares da espécie *Ocimum basilicum* L. (manjeriço, Figura 6) obtidos a partir das folhas cultivadas e oriundas da fazenda experimental “Campus Rural da UFS”, localizado na cidade de São Cristóvão no estado de Sergipe.



Figura 6. Folhas da espécie *Ocimum basilicum* L.

Os óleos essenciais dos sete cultivares foram extraídos e quimicamente caracterizados através do método de hidrodestilação de arraste a vapor, do tipo Clevenger (Tabela 1.) pelo laboratório de Fitotecnia do Departamento de Agronomia, e todos os procedimentos microbiológicos foram feitos no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Morfologia, ambos na Universidade Federal de Sergipe.

Tabela 1. Composição do óleo essencial dos cultivares utilizados neste estudo (PINTO, 2017).

Cultivar	% no óleo				
	1,8 Cineol	Linalol	Citral	Geraniol	Eugenol
Dark Opal	15,42	53,96	0	0	6,58
Genovese	8,19	49,57	0	0	29,69
Mrs. Burns	0,79	38,52	45,32	0,27	0
Napoletano	11,1	50,1	0	0	4,86
Italian Large (Isla)	10,04	57,96	0	0	12,59
Gen x Maria Bonita	4	67,07	12,8	2,05	0
Maria Bonita	5,11	77,23	0	13,28	0

4.2 Microrganismos e condições de cultivo

Para este estudo foram utilizados microrganismos *Gram*-positivo e *Gram*-negativo de grande importância na área de alimentos. Os microrganismos *Gram*-positivo utilizados foram: *Listeria monocytogenes* ATCC 4428, *Staphylococcus aureus* ATCC 8095, *Bacillus cereus* ATCC 10987. Os *Gram*-negativo foram: *Salmonella thyphimurium* ATCC 6539 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004. As bactérias *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* foram cultivadas em meio BHI (BrainHertinfusion, Acumedia) e incubadas a 37°C. *Salmonella sp.* foi cultivada em meio TSB (TryptoneSoyBroth, Merk) e *E. coli* em meio LB (Luria- Bertani). As culturas foram submetidas à coloração de Gram e à análise microscópica para avaliação do seu grau de pureza. Culturas puras dos isolados foram mantidas congeladas a -80°C no meio de crescimento com 20% de glicerol. No início de cada experimento, cada cultura pura foi estriada no mesmo meio de crescimento acrescido de ágar na concentração de 1,5% e, posteriormente, ativadas em meio líquido por 12h.

4.3 Espectro de atividade do óleo essencial

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi testada pelo método de difusão em ágar descrito por TAGG *et al.*, (1976). Inicialmente foram vertidos meios de cultura sólido e fundido (20mL) em placas de Petri e aproximadamente 10^8 UFC dos microrganismos foram inoculados nos respectivos meios de cultura. Após solidificação do meio, foram feitos orifícios de aproximadamente 5 mm e um volume de 25µL do óleo essencial acrescido de DMSO a 10% foi adicionado aos orifícios. As placas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C para difusão do óleo e posteriormente na temperatura de crescimento do microrganismo. Após 24 e 48 horas de incubação foi verificada a presença ou ausência de halos de inibição ao redor dos orifícios.

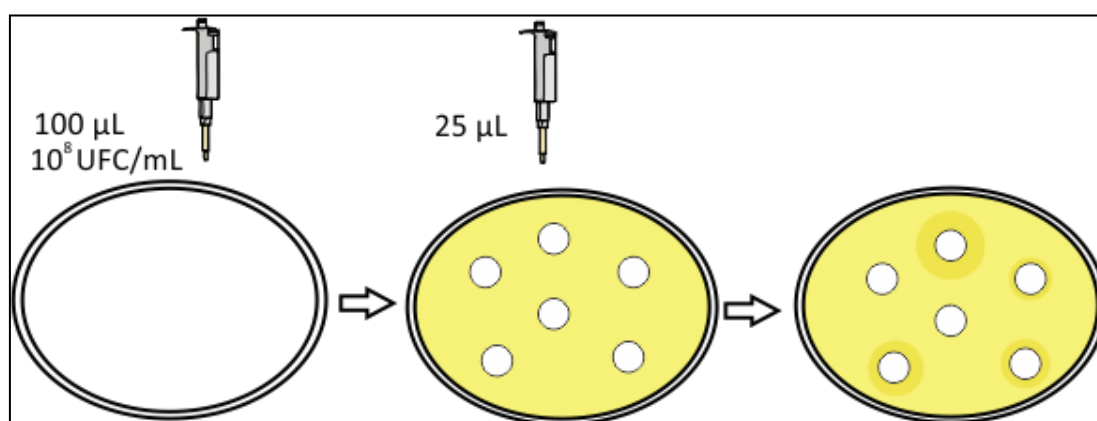


Figura 7. Ilustração do procedimento de difusão em ágar.

4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) do óleo essencial

A CIM do óleo essencial para os microrganismos foi determinada pelo método de microdiluição seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Concentrações crescentes do óleo foram acrescidas em meio líquido Mueller-Hilton distribuído em placas de Elisa e aproximadamente 10^5 UFC/mL dos microrganismos foram inoculados em duplicatas. As placas foram incubadas por 24h e foi considerada CIM a menor concentração do óleo que inibiu completamente o crescimento do microrganismo por 24 h. Para a determinação da DBM, todo o conteúdo das amostras (100 µL) em que não houve crescimento foi semeado em

meio sólido BHI e após 24h a presença de colônias foi analisada. A DBM foi definida como a menor concentração que resultou no não aparecimento de colônia em meio sólido.

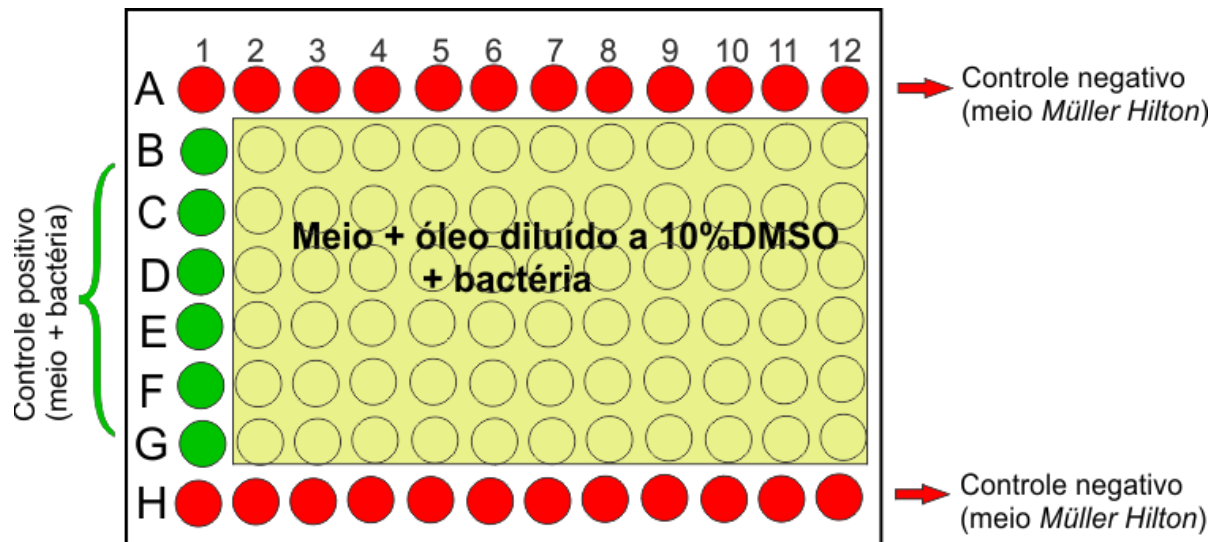


Figura 8. Ilustração do procedimento para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Para analisar a concentração inibitória mínima, diluições foram feitas nos pocinhos da placa ilustrada acima para saber até qual concentração o óleo inibia o crescimento da bactéria. Os valores das concentrações do óleo diluído a 10% de DMSO em cada poço encontram-se abaixo.

Concentrações do óleo em cada poço da placa:

B2 a G2: 125 $\mu\text{L/mL}$	B7 a G7: 3,9 $\mu\text{L/mL}$
B3 a G3: 62,5 $\mu\text{L/mL}$	B8 a G8: 1,95 $\mu\text{L/mL}$
B4 a G4: 31,25 $\mu\text{L/mL}$	B9 a G9: 0,97 $\mu\text{L/mL}$
B5 a G5: 15,62 $\mu\text{L/mL}$	B10 a G10: 0,48 $\mu\text{L/mL}$
B6 a G6: 7,81 $\mu\text{L/mL}$	B11 a G11: 0,24 $\mu\text{L/mL}$
	B12 a G12: 0.12 $\mu\text{L/mL}$

4.5 Efeito do óleo essencial no crescimento dos microrganismos

Este teste foi realizado apenas para a bactéria *S. aureus* e foram utilizados os óleos Maria Bonita e Mrs Burns. Para testar o efeito dos óleos no crescimento de *S. aureus*, concentrações crescentes (0, 3.9, 7.81, 31.25 $\mu\text{L/mL}$) dos mesmos foram adicionadas ao meio BHI e o crescimento foi monitorado pela leitura da densidade óptica (DO) a 600nm. Foi determinada a velocidade específica de crescimento, a duração da fase lag e o valor máximo de DO obtido para cada concentração. Tratamento controle sem adição de óleo essencial também foi realizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espectro de atividade do óleo essencial

O teste de difusão em meio sólido demonstrou a formação de halo de inibição do óleo essencial de todos os cultivares contra todos os microrganismos testados (Tabela 2). Este resultado demonstra que os óleos testados apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo tanto bactérias Gram-positivo quanto Gram-negativo. Além disso, estudos paralelos também demonstraram atividade antifúngica destes mesmos óleos, confirmando seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (PEREIRA *et al.*, 2006).

Tabela 2. Espectro qualitativo de atividade antibacteriana dos óleos essenciais de 7 cultivares de *Ocimum basilicum* L.

Microrganismo	Cultivares testados						
	Presença (+) ou ausência (-) de halo de inibição						
	Dark Opal	Genovese	Mrs. burns	Napoletano	Italian large (Isla)	Gen x maria bonita	Maria Bonita
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+

A atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com o composto majoritário de cada cultivar. Quase a totalidade do óleo dos cultivares testados, com exceção de Mrs. Burns, possui o monoterpeno Linalol como composto majoritário. O possível mecanismo de ação deste álcool é com relação à desnaturação de proteínas e da membrana, desidratação de células vegetativas, causando dano à bactéria, agindo tanto em bactérias Gram-positivo quanto em Gram-negativo, possuindo efeito mais eficiente contra linhagens Gram-positivo (CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2015).

No teste de difusão em ágar, a bacteriocina difunde radialmente a partir do orifício para o meio de cultura. Entretanto, vários fatores podem interferir na difusão da bacteriocina em meio sólido, e consequentemente, no tamanho do halo de inibição formado, como por exemplo, a quantidade de meio de cultura (OSTROSKY *et al.*, 2008). Portanto, este teste inicial foi utilizado apenas para verificar qual das linhagens apresenta ou não sensibilidade ao óleo essencial. Para um maior entendimento do grau de sensibilidade das linhagens foi determinado a CIM e DBM, descritas no próximo tópico.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) do óleo essencial

A concentração inibitória mínima dos óleos essenciais testados variou de 62,5 a 0,97 $\mu\text{L/mL}$ dependendo do microrganismo (Tabela 3). De uma maneira geral, os óleos essenciais dos cultivares Maria Bonita e da combinação entre Maria Bonita e Genovese, que apresentam como composto majoritário Linalol (77,23% e 67,07%, respectivamente), apresentaram maior eficiência frente à maioria das bactérias pois apresentaram menores valores de CIM. Os microrganismos que apresentaram menor sensibilidade (maiores valores de CIM- 62,5 $\mu\text{L/mL}$) para a maioria dos óleos testados foram *L. monocytogenes* e *S. typhimurium* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de cada cultivar frente às bactérias testadas.

Microrganismo	Cultivar testados						
	CIM ($\mu\text{L/mL}$)						
	Dark opal	Genovese	Mrs. Burns	Napoletano	Italian large (Isla)	Gen x maria bonita	Maria Bonita
<i>S. aureus</i>	62,5	62,5	31,25	15,62	31,25	15,62	15,62
<i>B. cereus</i>	15,62	31,25	7,81	31,25	31,25	31,25	1,95
<i>L. monocytogenes</i>	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	15,62	3,9
<i>E. coli</i>	3,9	62,5	15,62	31,25	15,62	7,81	1,95
<i>S. typhimurium</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	0,97	31,25
<i>E. sakazakii</i>	7,81	1,95	1,95	3,9	7,81	15,62	7,81

Considerando os menores valores de CIM, os óleos que apresentaram maior eficiência em inibir as bactérias Gram-positivo, *B. cereus* e *L. monocytogenes* foram, respectivamente, Mrs. Burns e Maria Bonita. Para *S. aureus*, os óleos Napoletano, GenX Maria Bonita e Maria Bonita apresentaram o mesmo efeito (CIM=15,62). Considerando as bactérias Gram-negativo, o Maria Bonita foi mais efetivo contra *E. coli* e a combinação entre Genovese e Maria Bonita contra *S. typhimurium*. *E. sakazakii* apresentou maior sensibilidade frente os óleos Genovese e Mrs. Burns (Tabela 3).

O menor valor de CIM pode ser observado frente à bactéria *S. typhimurium* (0,97 µL/mL/ cultivar Genovese x Maria Bonita). Apesar de apresentar o menor valor de CIM frente a este cultivar, com relação aos demais cultivares obteve os maiores valores amostrados (62,5 µL/mL/ cultivares Dark Opal, Genovese, Mrs. Burns, Napoletano e Italian Large (Isla)). Para *E. coli*, maior sensibilidade foi observada para o cultivar Maria Bonita, com CIM de 1,95 µL/mL. Mesmo valor de CIM foi observado para os cultivares Genovese e Mrs. Burns para o microrganismo *E. sakazakii* (Tabela 3).

Com relação à dose bactericida mínima (DBM), que diz respeito a menor concentração necessária para matar todas as células bacterianas em uma cultura, para a maioria dos casos, a DBM foi maior do que a CIM, mostrando que os óleos em baixas concentrações exercem efeito bacteriostático e em altas concentrações efeito bactericida. O efeito bacteriostático inibe o crescimento do microrganismo sem inativa-lo e o efeito bactericida inativa a célula. Exceção a essa observação é feita para *S. aureus* para o cultivar Mrs Burns, *B. cereus* para o cultivar Maria bonita, *L. monocytogenes* para os cultivares Genovese X Maria Bonita, *E.coli* para os cultivares Genovese, Mrs Burns e Italian large (Isla). Para *S. typhimurium*, e *E. sakazakii* a maioria dos cultivares exerceram atividade bactericida, independente da concentração (Tabela 4).

Tabela 4. Dose Bactericida Mínima (DBM) do óleo essencial de cada cultivar para as bactérias testadas.

Microrganismo	Cultivar testados						
	DBM ($\mu\text{L/mL}$)						
	Dark opal	Genovese	Mrs. Burns	Napoletano	Italian large (Isla)	Gen x maria bonita	Maria Bonita
<i>S. aureus</i>	125	125	31,25	31,25	62,5	31,25	31,25
<i>B. cereus</i>	>125	>125	>125	>125	>125	>125	1,95
<i>L. monocytogenes</i>	125	>125	62,5	>125	125	15,62	>125
<i>E. coli</i>	15,62	62,5	15,62	62,5	15,62	125	3,9
<i>S. typhimurium</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9	62,5
<i>E. sakazakii</i>	7,81	1,95	1,95	3,9	15,62	15,62	15,62

Os menores valores de DBM foram de 1,95 $\mu\text{L/mL}$ para as bactérias *B. cereus* (cultivar Maria Bonita) e *E. sakazakii* (cultivares Genovese e Mrs. Burns). O segundo menor valor de DBM (3,9 $\mu\text{L/mL}$) foi determinado para *E. coli* (cultivar Maria Bonita), *S. typhimurium* (cultivar Genovese x Maria Bonita) e *E. sakazakii* (cultivar Napoletano) (Tabela 4).

Como já foi mencionado anteriormente, o possível mecanismo de ação para a maioria dos cultivares envolve a desnaturação de proteínas e danos à membrana citoplasmática, já que o composto majoritário da maioria deles é o Linalol (CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2015). Exceção a essa observação é feita para o cultivar Mrs Burns, cujo composto majoritário é o Citral que contra o *S.aureus* pode danificar a membrana celular e inibir a bomba de efluxo, afetando assim o potencial de membrana (GUPTA *et al*, 2017).

Os resultados obtidos para CIM e DBM demonstraram heterogeneidade na sensibilidade dos microrganismos aos óleos testados. Considerando os menores valores de CIM e DBM obtidos, os óleos essenciais foram mais efetivos em inibir as bactérias Gram-negativo. Esses resultados contrariam os resultados obtidos em outros estudos, que afirmam óleos que possuem como composto majoritário o Linalol possuem efeito mais eficiente contra linhagens Gram-positivo (CAMARGO; DE VASCONCELOS, 2015).

5.3 Efeito do óleo essencial no crescimento dos microrganismos

A adição de concentrações crescentes dos óleos essenciais ao meio BHI resultaram em diminuição da taxa de crescimento e DO máxima atingida por *S. aureus*. Entretanto, nas concentrações dos óleos em que houve crescimento, não foi observada alteração na duração da fase lag em relação ao tratamento controle (sem óleo essencial), que teve duração de 1 h (Tabela 5). Para o tratamento controle a taxa de crescimento foi de $0,36 \text{ h}^{-1}$ e a DO máxima observada foi de 1,15. Nas concentrações de 3,9 e 7,81 $\mu\text{L/mL}$ dos óleos essenciais testados, foram observadas diminuições em até 80 e 90%, respectivamente, na taxa de crescimento de *S. aureus*. Em relação à DO máxima atingida, para o óleo do cultivar Maria Bonita, a redução foi de aproximadamente 50% nas concentrações menores do óleo. Para o cultivar Mrs Burns a DO após 48 h nas concentrações de 3.9 e 7.81 $\mu\text{L/mL}$ foi 54 e 68%, respectivamente, menor em relação ao controle (Tabela 5). Na concentração de 31,25 $\mu\text{L/mL}$, que corresponde ao valor de DBM dos óleos para *S. aureus* (Tabela 4) o crescimento não foi observado até 24 h de incubação. Após 48h, a DO foi aproximadamente 80% menor em relação ao controle (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do óleo Mrs. Burns e Maria Bonita nos parâmetros de crescimento de *S. aureus*.

Óleo essencial	[] óleo ($\mu\text{L/mL}$)	Fase lag (h)	μ (h^{-1})	DO máxima
Mrs. Burns	0	1h	0,36	1,15
	3,9	1h	0,065	0,531
	7,81	1h	0,038	0,365
	31,25	>24h	ND	0,245
Maria Bonita	0	1h	0,36	1,154
	3,9	1h	0,088	0,551
	7,81	1h	0,104	0,565
	31,25	>24h	ND	0,107

ND= Não determinado

6 CONCLUSÃO

Foi possível inferir que os óleos essenciais dos sete cultivares (Dark Opal, Genovese, Mrs. Burns, Napoletano, Italian Large (Isla), Genovese x Maria Bonita, Maria Bonita) possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, pois inibiram tanto bactérias Gram-positivo (*S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*) quanto Gram-negativo (*E. coli*, *S. typhimurium* e *E. sakazakii*).

A determinação da CIM e da DBM demonstraram heterogeneidade na sensibilidade dos microrganismos frente aos óleos essenciais dos diferentes cultivares. Considerando os menores valores de CIM e DBM, os óleos essenciais foram mais efetivos em inibir as bactérias Gram-negativo. Na maioria dos casos, a DBM foi maior que a CIM, demonstrando que em baixas concentrações os óleos exercem efeito bacteriostático e em altas concentrações, bactericida.

A adição de concentrações crescentes dos óleos essenciais Mrs. Burns e Maria Bonita ao meio BHI resultaram em diminuição da taxa de crescimento e DO máxima atingida por *S. aureus*. Apesar destes testes não terem sido realizados com os demais óleos e microrganismos, espera-se resultados semelhantes para todos.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os óleos testados apresentam potencial para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores em alimentos. Talvez uma forma efetiva para esse uso seja pela incorporação dos óleos a revestimentos comestíveis. O melhor tipo de revestimento e o alimento mais adequado para esse uso ainda serão testados.

7 REFERÊNCIAS

- AKYOL, Ismail. Development and application of RTi-PCR method for common food pathogen presence and quantity in beef, sheep and chicken meat. **Meat science**, v. 137, p. 9-15, 2018.
- AL ABBASY, Dalia Waleed et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 645-649, 2015.
- ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Molecular Oral Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.
- ATARÉS, Lorena; CHIRALT, Amparo. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in food science & technology**, v. 48, p. 51-62, 2016.
- BAJPAI, Vivek K.; RAHMAN, Atiqur; KANG, Sun Chul. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 117-122, 2008.
- BARATA, Lauro ES. A economia verde: Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012.
- BARBOSA, Lidiane Nunes et al. Essential oils from herbs against foodborne pathogens in chicken sausage. **Journal of oleo science**, v. 64, n. 1, p. 117-124, 2015.
- BERTINI, Luciana Medeiros et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.
- BORTOLO, Daniela Perez Guerrero et al. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. 2008.
- BRAGA, Carla de Moraes. Histórico da Utilização de Plantas Medicinais. 24f. **Monografia (Licenciatura em Biologia)–Universidade de Brasília e Universidade Federal de Goiás, Brasília**, 2011.

BRANT, R. S. et al. Teor do óleo essencial de cidrao [*Aloysia triphylla* (LHér.) Britton] em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 83-88, 2008.

CAMARGO, Samuel Barbosa; DE VASCONCELOS, Darizy Flavia Silva Amorim. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2015.

CARVALHO, Poliana MM et al. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. **Biotechnology Reports**, v. 17, p. 31-34, 2018.

CECILIO FILHO, Arthur Bernardes et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, p. 171-177, 2000.

CERQUEIRA, Martins Dias de et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). 2009.

CHEN, Zhifen et al. Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from *Alpiniaguilinis* against selected foodborne pathogens. **Industrial crops and products**, v. 83, p. 607-613, 2016.

CHINNUSAMY, Viswanathan; ZHU, Jianhua; ZHU, Jian-Kang. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in plant science**, v. 12, n. 10, p. 444-451, 2007.

COSTA, Alexandra. Nutrição mineral em plantas vasculares. **Universidade de Évora**, 2014.

COSTA, D. Carvalho et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 336-354, 2015.

COUTINHO, PhD Henrique Douglas Melo et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.

DA SILVA, Jandiê Araújo et al. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* sp. tracheiphilum em sementes de Caupi. **Ciência Agrotec**, v. 33, n. 2,

p. 611-616, 2009.

DE MORAIS, Lília Aparecida Salgado. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.

DE OLIVEIRA LIMA, M. I. et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 2, p. 195-202, 2017.

DE OLIVEIRA, Ariana Reis Messias Fernandes et al. Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. **Ceres**, v. 59, n. 2, 2015.

DELATORE, Lucinéia S.S; ROYER, M. Regina. **Estudo das plantas aromáticas e medicinais como alternativa para uso e aprendizagem**. O professor PDE e os desafios da escola pública paranaense, Vol I, 21págs, 2010.

DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge. Usos Lícito e Ilícito dos Fármacos. **Acta Medica Portuguesa**, v. 27, n. 6, 2014. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000300006&script=sci_arttext&lng=pt> Acesso em: 08/12/2017.

DONSÌ, Francesco et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908-1914, 2011.

DRA, Loubna Ait et al. Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 746-752, 2017.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

DUSTIN, Cary D.; COOPER-DRIVER, Gillian A. Changes in phenolic production in the hay-scented fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochemical systematics and ecology**, v. 20, n. 2, p. 99-106, 1992.

ELSSER-GRAVESEN, Dieter; ELSSER-GRAVESEN, Anne. Biopreservatives. In: **Biotechnology of Food and Feed Additives**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.

p. 29-49.

ESPINA, Laura et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 1, p. 9-16, 2012.

EVRENDILEK, Gulsun Akdemir. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 202, p. 35-41, 2015.

FABER, Marcos. A importância dos rios para as primeiras civilizações. **História ilustrada**, v. 2, 2013.

FDA. **U.S. Food and Drug Administration**. Disponível em:

<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfrCFRSearch.cfm?fr=182.20>

> Acesso em: 26/11/2017.

FENG, Wu et al. Combination of cassia oil with magnesium sulphate for control of postharvest storage rots of cherry tomatoes. **Crop Protection**, v. 27, n. 1, p. 112-117, 2008.

FIGUEIREDO, A. Cristina; PEDRO, Luis G.; BARROSO, José G. Plantas aromáticas e medicinais-óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH N.º**, v. 114, p. 30, 2014.

FIGUEIREDO, Adda Daniela Lima et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 193-196, 2009.

FRANCO, Alexandre Puglisi Barbosa et al. Fatores de variação na caracterização da fertilidade do solo visando adubação: estudo de caso na região sul de Goiás. 2008.

FRANZ, Chlodwig M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 3, p. 112-113, 2010.

FUMAGALI, Elisângela et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GARCÍA, Adolfo Ávalos; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GOUVEA, Dayana Rubio et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 1, p. 14-28.

GUPTA, Priyanka et al. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 34, p. 85-96, 2017.

GUTIERREZ, Jorge; BARRY-RYAN, Catherine; BOURKE, Paula. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v. 107, n. 2, p. 160-169, 1996.

HOMMA, Alfredo Kingo Oyama. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia?. **estudos avançados**, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012. Disponível em <<http://www.revistas.usp.br/eav/article/view/10631/12373>>. Acesso em: 08/12/2017.

HU, Kun et al. A modeling framework to accelerate food-borne outbreak investigations. **Food Control**, v. 59, p. 53-58, 2016.

JAY, James M. Microbiologia de alimentos: 6ª edição; trad. Eduardo Cesar Tondo et al – Porto Alegre: Artmed, 2005, 711 pags.

KHAN, Imran et al. Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 35, n. 3, p. 316-322, 2015.

KIM, Sang-Soon; KANG, Dong-Hyun. Combination treatment of ohmic heating with various essential oil components for inactivation of food-borne pathogens in buffered peptone water and salsa. **Food Control**, v. 80, p. 29-36, 2017.

KIRKBY, Ernest Arnold; RÖMHELD, Volker. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações agrônômicas**, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.

LACHOWICZ, K. J. et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 209-214, 1998.

LIMA, R. K. et al. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. 2013.

LUBIAN, C. T. et al. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 157-162, 2010.

LUÍS, Ângelo et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 274-282, 2016.

MAIA, José Guilherme S.; ANDRADE, Eloísa Helena A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MATTEI, Dariane et al. Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes à base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* L.-LAMIACEAE. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 16, n. 2, p. 129-136, 2013.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MENDONÇA, A. T. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. 2005.

MESQUITA, Sumaia G. et al. Chemical constituents from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 563-568, 2008.

Ministério da Saúde, Secretaria da vigilância em saúde, junho de 2016. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Disponível em <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf> > Acesso em: 28/09/2017.

MONTES, S. de S.; SANTANA-NETA, L. G.; CRUZ, Renato Souza. Óleos essenciais em embalagens para alimentos-Revisão de literatura de 2000 a 2012. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693**, v. 5, n. 1-2, p. 1, 2014.

NASCIMENTO, Paula FC et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, Ana Beatriz Almeida de et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 30, n. 3 (Jul./set. 2010), p. 279-285**, 2010.

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Rev Bras PI Med**, v. 18, p. 502-510, 2016.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZDIKMENLI, Seda; DEMIREL ZORBA, Nukhet N. Evaluation of usage of essential oils instead of spices in meat ball formulation for controlling *Salmonella* spp. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 2, p. 93-101, 2016.

PADUCH, Roman et al. Terpenos: substâncias úteis nos cuidados de saúde humanos. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PAUDYAL, Narayan et al. Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries—A meta-analysis. **International journal of food microbiology**, v. 249, p. 35-43, 2017.

PEREIRA, Marcelo Cláudio et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PINTO, Jéssika Andreza Oliveira. **Influência da época de plantio na produção de cultivares e híbridos de manjeriço**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, 2017.

PINU, Farhana R. Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: application of metabolomics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 213-215, 2016.

Portaria nº 212/1981. Ministério da Saúde. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd03_18.pdf> Acesso em: 25/12/2017.

PORTO, ROMULO DE SOUSA. **Ação do óleo essencial de *Crotonargyrophylloides* muell. Arg. e de um de seus constituintes o β - cariofileno em músculo liso fásico de rato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, 2010.

PROENÇA DA CUNHA, A.; RIBEIRO, J. A.; ROQUE, O. R. Plantas aromáticas em Portugal. **Caracterização e utilizações. Edições Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa**, 2007.

RAUHA, Jussi-Pekka et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International journal of food microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>> Acesso em: 20/12/2017.

RIBEIRO, Edilene Carvalho Gomes et al. Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica maranhense. 2016.

RIVEROS, Cecilia G.; NEPOTE, Valeria; GROSSO, Nelson R. Thyme and basil essential oils included in edible coatings as a natural preserving method of oilseed kernels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 183-191, 2016.

ROCA-PÉREZ, Luis et al. Seasonal cardenolide production and Dop5 β r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1869-1878, 2004.

RODRIGUES, Angelo Giovani et al. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de assistência farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília:(DF): MS**, p. 9-28, 2006.

RODRIGUES, Lindaiane Bezerra et al. Atividade anti-inflamatória do óleo essencial obtido a partir de *Ocimum basilicum* complexado com β -ciclodextrina (β -CD) em camundongos. **Toxicologia alimentar e química**, 2017.

ROOSTA, Rokhsareh Asl; MOGHADDASI, Reza; HOSSEINI, Seyed Safdar. Export target markets of medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 7, p. 84-88, 2017.

SAKKAS, Hercules; PAPADOPOULOU, Chrissanthy. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 429-438, 2017.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura et al. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2011.

SANTOS, G. G. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas Antimicrobial activity of essential oils of cidreira-herb and basil against bacteria from bovine meat. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 4, p. 529-536, 2011.

SHARMA, Y.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 3, p. 244-254, 2016.

SILVA, Silvia RS et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SIROLI, Lorenzo et al. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 302-310, 2015.

SKELLY, A. The Blooming of Botanicals. *The Nutrition*, [S.l.], p. 13, Summer, 1996.

SOARES, Rilvaynia Dantas et al. Influência da temperatura e velocidade do ar na secagem de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) com relação aos teores de óleos essenciais e de linalol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1108-1113, 2007.

SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino; MIRANDA-NOVALES, Maria Guadalupe. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUZA, Evandro Leite et al. Cytotoxic effects of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils alone and combined at sublethal amounts on *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable broth. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 163-171, 2013.

SOUZA, Jefferson Franklyn Vieira de. Atividade anestésica do óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* em alevinos de tambatinga. 2017.

SUPPAKUL, Panuwat et al. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3197-3207, 2003.

SWANGER, Nancy; RUTHERFORD, Denney G. Foodborne illness: the risk environment for chain restaurants in the United States. **International Journal of Hospitality Management**, v. 23, n. 1, p. 71-85, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. **Porto Alegre: Artmed**, v. 719, 2004.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, Salam A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

TRAJANO, Vinicius Nogueira et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14,

n. 1, p. 57-67, 2012.

VERMA, Nidhi; SHUKLA, Sudhir. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105-113, 2015.

WANNES, Wissem Aidi et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WHO, 2003. **State of the art of new vaccines: Research and development**. World Health Organization, Geneva (2003).

YÁÑEZ, Patricio et al. Comparación de la actividad acaricida de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* contra *Tetranychus urticae*. **LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida**, v. 19, n. 1, 2014.

YUE, Lin et al. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent. **Carbohydrate polymers**, v. 176, p. 356-364, 2017.

ZHANG, Yunbin et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.